

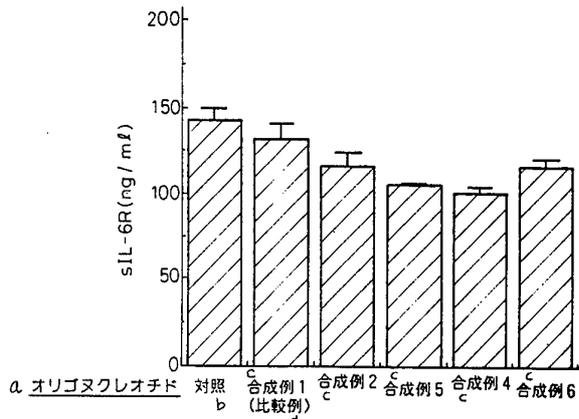


特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 5 A61K 31/70, 48/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 94/25036  (43) 国際公開日 1994年11月10日 (10. 11. 94)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP93/01736 (22) 国際出願日 1993年11月29日 (29. 11. 93)  (30) 優先権データ 特願平5/104561 1993年4月30日 (30. 04. 93) JP  (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) (JP/JP) 〒115 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 藤田 潤 (FUJITA, Jun) (JP/JP) 〒606 京都府京都市左京区吉田河原町14 マンハイム鴨川301号 Kyoto, (JP) (74) 代理人 弁理士 宇井正一, 外 (UI, Shoichi et al.) 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号 静光虎ノ門ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)  (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>		

(54) Title : EXPRESSION INHIBITOR CONTAINING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-6 RECEPTOR

(54) 発明の名称 ヒトインターロイキン6レセプターに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含む発現阻害剤



- a ... Oligonucleotide
- b ... Control
- c ... Synth. Ex.
- d ... Comp. Ex.

(57) Abstract

An expression inhibitor against human interleukin-6 receptor (IL-6R), containing as the active ingredient an antisense oligonucleotide derivative which hybridizes in the region of a sequence comprising 9-30 consecutive bases and containing an initiator codon of an mRNA coding for human IL-6R.

(57) 要約

ヒトインターロイキン-6レセプター (ヒトIL-6R)をコードする mRNAの翻訳開始コドンを含む9~30個の連続する塩基配列の領域にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を有効成分とする、ヒトIL-6Rの発現阻害剤が提供される。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	CZ	チェッコ共和国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュー・ジーランド
AT	オーストリア	DE	ドイツ	KR	大韓民国	PL	ポーランド
AU	オーストラリア	DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	PT	ポルトガル
BB	バルバドス	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	RO	ルーマニア
BE	ベルギー	ES	スペイン	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
BF	ブルキナファソ	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SD	スーダン
BG	ブルガリア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SE	スウェーデン
BJ	ベナン	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BR	ブラジル	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BY	ベラルーシ	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
CA	カナダ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TD	チャード
CF	中央アフリカ共和国	GR	ギリシャ	ML	マリ	TG	トーゴ
CG	コンゴ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TJ	タジキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TT	トリニダードトバゴ
CI	コートジボワール	IT	イタリア	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	JP	日本	NE	ニジェール	US	米国
CN	中国	KE	ケニア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン共和国
CS	チェッコスロヴァキア	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	VN	ヴェトナム

## 明 細 書

ヒトインターロイキン6レセプターに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含む発現阻害剤

## 技術分野

本発明は、ヒトインターロイキン-6レセプター（ヒトIL-6R）の発現を阻害する医薬として有用なアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体に関する。

## 背景技術

ヒトインターロイキン-6（ヒトIL-6）はB細胞の抗体産生細胞への最終段階の分化を誘導する因子としてクローニングされたサイトカインであり（Kishimoto T ら、Blood 74,1-10,1989）、現在では肝臓における急性期蛋白の誘導などさまざまな作用を持つことが知られている（Kishimoto T ら、Blood 74,1-10,1989）。

またヒトIL-6はリンパ系細胞のみにかぎらず、線維芽細胞、血管内皮細胞、膀胱癌細胞株T24やグリオブラストーマなどにおいても産生されていることが報告され（Kohase M. ら、J. Cell Physiol. 132,271-278,1978；Meir EV ら、Cancer Res. 50,6683-6688,1990）、さらにその標的細胞も多種類にわたっている（Kishimoto T ら、Blood 74,1-10,1989）。

近年Kawano MらによりヒトIL-6が骨髄腫細胞ではautocrine growth factorとして機能していることが報告され（Kawano Mら、Nature, 332,83-85,1988）、さらに腎細胞癌においても同様のことが報告された（Miki Sら、FEBS Letter 250,607-610,1989）。

一方、ヒトIL-6による細胞の増殖あるいは分化のシグナルは細胞

表面に存在するヒトIL-6R 及び糖蛋白質gp130 を介して細胞に伝達されることが知られている。(Taga T. ら、Cell 58, 573-581, 1989; Hibi Mら、Cell 68, 1149-1157, 1990)。

近年、病態の原因となっている遺伝子の働きを抑制する方法として、DNA から転写されたmRNAに相補的なオリゴヌクレオチド(アンチセンスオリゴヌクレオチド)を用いて、該蛋白質の発現を抑制することが提案されている(村上、化学、46巻、681-684 頁、1991)。

さらには、アンチセンスオリゴヌクレオチドの寿命、安定性、細胞への取り込み効率などの問題点を解消する方法としてヌクレオチドのリン酸基の酸素をメチル基に置換したメチルホスホネート型誘導体やイオウに置換したホスホロチオエート型誘導体などの修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドが知られており(村上、前述)、実際これらのアンチセンスヌクレオチドがウィルスの蛋白質合成を阻害することが認められている(Agris, C. H. ら、Biochemistry, 25, 6268-6275, 1986)。

このような考えをもとにLevy Yらは、ヒトIL-6のmRNAの翻訳をアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害することにより、ヒトIL-6を増殖因子としている骨髓腫細胞株の増殖が抑制されることを確認した(Lovy Yら、J. Clin. Invest., 88, 696-699, 1991)。

しかしながら、ヒトIL-6R を発現する種々の細胞においてIL-6Rの発現を有意に抑制するようなアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体については知られていない。

#### 発明の開示

従って本発明は、ヒトIL-6R の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を提供しようとするものである。

さらに詳しくは、本発明は、ヒトIL-6R をコードするmRNAの翻訳

開始コドンを含む少なくとも 9 個の連続する塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成るヒト IL-6R の発現阻害剤を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は実験例における本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体が可溶性 IL-6R の発現を抑制することを示すグラフである。

#### 発明を実施するための具体的な形態

本発明者はヒト IL-6R をコードする mRNA の翻訳開始コドンを含む少なくとも 9 個の連続する塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を合成し、ヒト腎細胞癌とともに培養したところ癌の増殖を抑制することを見出した。

本発明の好ましい態様においては、ヒト IL-6R をコードする mRNA の翻訳開始コドンを含む 9 ～ 30 個、より好ましくは 12 ～ 25 個の連続する塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を用いる。

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA 又は mRNA の所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドがすべて相補的であるもののみならず、DNA 又は mRNA とオリゴヌクレオチドとが安定にハイブリダイズできる限り、多少のミスマッチが存在してもよい。

ヒト IL-6R の翻訳開始コドンおよびその近傍の塩基配列は次の通りである（例えば特開平 2 - 288,898 号公報参照）(配列番号：1)。

1

-1

```

5' CTGTCCGCCTCTGCGGGACCATGGAGTGGTAGCCGAGGAGGAAGC
ATG CTG GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG 3'
Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala

```

従って、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の塩基配列は、第1アミノ酸MetのコードンのATGを含みその5'側および3'側の連続する塩基配列から適宜選択できるものである。

本発明の1つの態様によれば、発現阻害オリゴヌクレオチドは、配列番号：1における開始コドンATGとその下流の配列とから成る塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドであり、例えば、第1位のMetから第5位のGlyまでをコードするコードンの塩基配列に相補的なヌクレオチド配列、すなわち、5' GCCGACGGCCAGCAT - 3' (配列番号：2)を有するものである。

本発明の好ましい態様によれば、発現阻害オリゴヌクレオチドは、配列番号：1における開始コドンとその上流の配列とから成る塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。この様なオリゴヌクレオチドの1例として、開始コドンATGとその上流の17個の塩基とに対して相補的な塩基配列、すなわち5' - CATGCTTCCTCC TCGGCTAC - 3' (配列番号：3)を有するものが挙げられる。また、他の1例として、開始コドンとその上流の12個の塩基とに対して相補的な塩基配列、すなわち5' - CATGCTTCCTCCTCG - 3' (配列番号：4)を有するものが挙げられる。

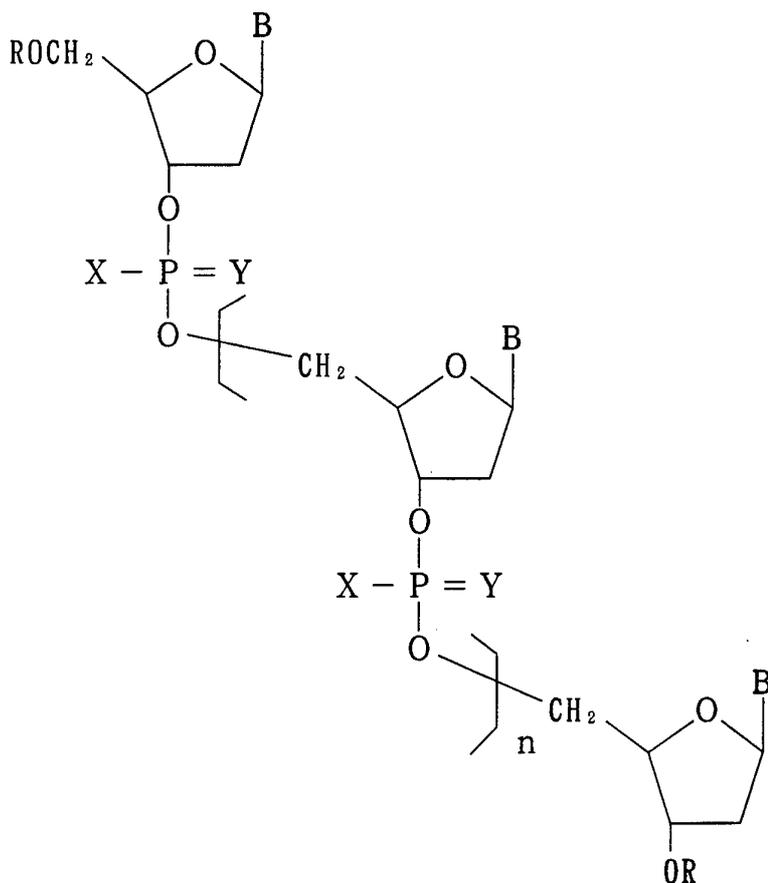
本発明の他の好ましい態様によれば、発現阻害オリゴヌクレオチドは、配列番号：1における開始コドン並びにその上流及び下流の配列から成る塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。この様なオリゴヌクレオチドの1例として、開始コドン並びにその上流の11個の塩基及び下流の6個の塩基から成る塩基配列に対して相補的な塩基配列、すなわち5' - GGCCAGCATGCTTCCTCCTC - 3' (配列番号：5)を有するものが挙げられる。

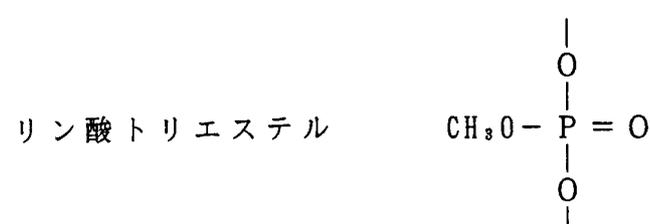
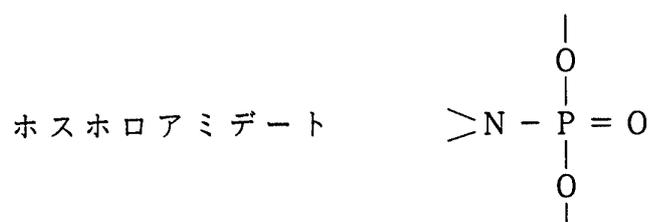
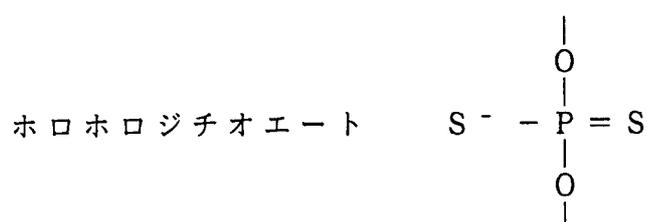
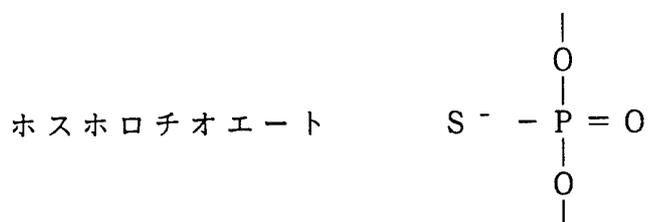
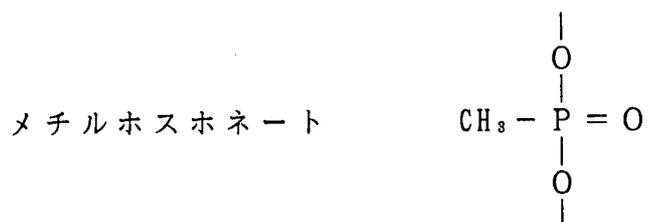
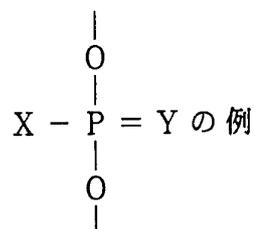
本発明において使用されるオリゴヌクレオチド誘導体がデオキシリボヌクレオチドの場合それぞれの構造は、構造式1に示したとお

りであるが、Xは独立して、イオウ（S）、低級アルキル基あるいは一級アミンまたは二級アミンのいずれでもよい。Yは独立して酸素（O）あるいはイオウ（S）のいずれでもよい。Bはアデニン、グアニン、チミン、あるいはシトシンのいずれかから選ばれ、主としてヒトIL-6レセプターをコードするDNA又はmRNAの相補的オリゴヌクレオチドである。Rは独立して水素またはジメトキシトリチル基あるいは低級アルキル基である。nは7-28である。

好ましいオリゴヌクレオチド誘導体としては例えば前述のメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、その他ホスホロチオエート修飾体あるいはホスホロアミデート修飾体等が挙げられる（後記構造式2を参照のこと）。

#### 構造式1



構造式 2

構造式 1 の X 及び Y が O であるオリゴヌクレオチドは市販の DNA 合成装置（例えば Applied Biosystems 社製など）によって容易に合

成される。

合成法はホスホロアミダイトを用いた固相合成法、ハイドロジェンホスホネートを用いた固相合成法などで得ることができる。

例えば、T. Atkinson, M. Smith, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 35-81(1984); M. H. Caruthers, *Science*, 230, 281(1985); A. Kume, M. Fujii, M. Sekine, M. Hata, *J. Org. Chem.*, 49, 2139(1984); B. C. Froehler, M. Matteucci, *Tetrahedron Lett.*, 27, 469(1986); P. J. Garegg, I. Lindh, T. Regberg, J. Stawinski, R. Stromberg, C. Henrichson, *ibid.*, 27, 4051(1986);

B. S. Sproat, M. J. Gait, in *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, ed. M. J. Gait, IRL Press, 83-115(1984); S. L. Beaucage and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1859-1862(1981); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.*, 21, 719-722(1980); M. D. Matteucci and M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191(1981) を参照のこと。

Xが低級アルコキシ基であるリン酸トリエステル修飾体は、常法、例えば化学合成で得られたオリゴヌクレオチドをトシルクロリドのDMF/メタノール/2, 6-ルチジン溶液で処理することにより得ることができる (Moody H. M., et al., *Nucleic Acids Res.*, 17, 4769-4782(1989))。

Xがアルキル基であるアルキルホスホネート修飾体は、常法、例えばホスホアミダイトを用いて得ることができる (M. A. Dorman, et al., *Tetrahedron*, 40, 95-102(1984); K. L. Agarwal and F. Riftina, *Nucleic Acids Res.*, 6, 3009-3024(1979))。

XがSであるホスホロチオエート修飾体は、常法、例えばイオウを用いた固相合成法 (C. A. Stein, et al., *Nucleic Acids Res.*, 16, 3209-3221(1988))あるいはテトラエチルチウラム ジスルフィドを

用いて、固相合成法により得ることができる (H. Vu and B. L. Hirschbein, *Tetrahedron Letters*, 32, 3005-3008(1991))。

X, YがともにSであるホスホロジチオエート修飾体は、例えばビスアミダイトをチオアミダイトに変換しイオウを作用させることにより固相合成法により得ることができる (W. K. -D. Brill, et. al., *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2321-2322(1989))。

Xが一級アミンあるいは二級アミンであるホスホロアミデート修飾体は、例えばヒドロジェンホスホネートを一級あるいは二級アミンで処理することにより固相合成法で得ることができる (B. Froehler, et. al. *Nucleic Acids Res.*, 16, 4831-4839(1988))。あるいは、アミダイトをtert-ブチルヒドロパーオキサイドで酸化しても得ることができる (H. Ozaki, et. al., *Tetrahedron Lett.*, 30, 5899-5902(1989))。

精製および純度確認は、高速液体クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で行うことができる。分子量の確認は、Electrospray Ionization Mass Spectrometry 又はFast Atom Bombardment-Mass Spectrometry で行うことができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体はヒトIL-6R をコードするDNA 又はmRNAの塩基配列にハイブリダイズする配列を有するものであれば、その合成法や由来はいずれでもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、ヒトIL-6R の産生細胞に作用して、ヒトIL-6R をコードするDNA 又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害し、ヒトIL-6R の発現を抑制することによって結果的にヒトIL-6の作用を抑制する効果を有する。本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体により抑制されるヒトIL-6の作用としては、血小板増多作用、抗体産生増強作用、急性期蛋白誘導作用、腫瘍細胞増殖作用、神経細胞分化作用

等が挙げられる。

従って、これらの作用に起因する疾患、例えば腎癌、ミエローマ、リンネルトTリンパ腫、カポジ肉腫などの癌、慢性関節リウマチ等の自己免疫疾患、メサンギウム増殖性腎炎、乾癬、癌性悪液質、感染症におけるエンドトキシンショック等の治療において本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は有効であると考えられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤などの外用剤とすることができる。また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法に従って調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、または血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適応させる。さらに持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L-リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100 mg/kg好ましくは0.1~50mg/kgの範囲で投与することができる。

以下本発明を実施例において詳しく説明する。

## 実施例

合成例 1

5' - GCCGACGGCCAGCAT - 3' (配列番号: 2) の合成  
ヒトIL-6R アンチセンスオリゴヌクレオチドとしてヒトIL-6レセプターmRNAの開始コドンよりの5コドンに相補的な15ヌクレオチド (GCCGACGGCCAGCAT) (配列番号: 2) を、DNA 合成装置 (Gene Assembler Plus, Pharmacia社製) で合成した。

合成例 2

5' - GCCGACGGCCAGCAT - 3' (配列番号: 2) (ホスホロチオエート修飾体) の合成

3' - 水酸基が支持体に結合した5' - ジメトキシトリチルチミジン (1  $\mu$ mol) のジメトキシトリチル基をトリクロロ酢酸によって脱保護し、その5' - 水酸基に5' - ジメトキシトリチルデオキシアデノシン  $\beta$ -シアノエチルホスホアミダイト誘導体をテトラゾールにより縮合し、テトラエチルチウラム ジスルフィドによってリンをイオウ化した後、未反応の5' - 水酸基を無水酢酸とジメチルアミノピリジンでアセチル化する。

同様に脱保護、縮合、イオウ化、アセチル化を繰り返す。最後の5' - ジメトキシトリチルデオキシグアノシン  $\beta$ -シアノエチルホスホアミダイト誘導体を縮合し、イオウ化して得られた15-mer のホスホロチオエート修飾体 (以上までの工程はApplied Biosystems社製381A型DNA 合成装置により行った)。を濃アンモニア水2mlによって支持体から切り出すと共に、リンからシアノエチル基をはずし、さらにアデニン、グアニン、シトシンに付いている保護基をはずす。

得られた5' - ジメトキシトリチルオリゴヌクレオチドホスホロチオエートは未精製のまま、または高速液体クロマトグラフィーに

より精製した後、トリフルオロ酢酸 5 ml によって 5' - ジメトキシ保護基をはずす。得られたオリゴヌクレオチドホスホロチオエートを必要があれば高速液体クロマトグラフィーで精製し、目的の 5' - GCCGACGGCCAGCAT - 3' (配列番号: 2)(ホスホロチオエート修飾体) 約 2.09mg を得る。

#### 合成例 3

5' - GCGCAGCCGACGGCCAGCAT - 3' (配列番号: 6)(ホスホロチオエート修飾体) の合成

合成例 2 と同様にして、目的の 5' - GCGCAGCCGACGGCCAGCAT - 3' (配列番号: 6)(ホスホロチオエート修飾体) 約 1.81mg を得る。

#### 合成例 4

5' - CATGCTTCCTCCTCGGCTAC - 3' (配列番号: 3)(ホスホロチオエート修飾体) の合成

合成例 2 と同様にして、目的の 5' - CATGCTTCCTCCTCGGCTAC - 3' (配列番号: 3)(ホスホロチオエート修飾体) 約 1.96mg を得る。

#### 合成例 5

5' - CATGCTTCCTCCTCG - 3' (配列番号: 4)(ホスホロチオエート修飾体) の合成

合成例 2 と同様にして、目的の 5' - CATGCTTCCTCCTCG - 3' (配列番号: 4)(ホスホロチオエート修飾体) 約 1.91mg を得る。

#### 合成例 6

5' - GGCCAGCATGCTTCCTCCTC - 3' (配列番号: 5)(ホスホロチオエート修飾体) の合成

合成例 2 と同様にして、目的の 5' - GGCCAGCATGCTTCCTCCTC - 3' (配列番号: 5)(ホスホロチオエート修飾体) 約 1.08mg を得る。

#### 実験例 1. ヒト可溶性 IL-6R の発現抑制効果

ヒト IL-6R 遺伝子 (特開平 2 - 288, 898 号第 2 図及び第 3 図参照)

から Nco I フラグメントを作製し、それにTAG リンカー (CATGTAGA GATCT)を付加し、CHO 発現ベクターpdR(文献名:M. Hasegawa, Eur. J. Biochem., 210, 9-12 (1992))に挿入し、可溶性IL-6R 発現ベクター (pRNDR1) を構築した。

pRNDR1をdhfr<sup>-</sup>・CHO 細胞にリン酸カルシウム法により導入し、MTX にて増幅した。最終的に1  $\mu$ M MTX耐性可溶性IL-6R 産生CHO 細胞(CHO・RN1)を得た。このpRNDR1には配列番号1の翻訳開始コードンATGの上流(5'側)-26番目から始まる可溶性IL-6R 遺伝子が含まれている。

細胞の培養は1%FCS(ベーリンガーマンハイム社製)及び1  $\mu$ M MTXを含むIMDM培地(GIBCO社製)で行った。

96穴の培養プレート上でCHO・RN1 培養液75  $\mu$ l ( $6.6 \times 10^4$  個/ml)に10  $\mu$ MのヒトIL-6R アンチセンスオリゴヌクレオチド75  $\mu$ lを加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。

24時間培養後、その培養上清の可溶性IL-6R 量をマウス抗IL-6R モノクローナル抗体(MT-18)(特開平2-288,898号参照)及びウサギ抗IL-6R ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法によって測定した。

なお、対照(コントロール)としては上記培養液のみをまた比較例として合成例1で得られたオリゴヌクレオチドを用いて測定した。

ヒトIL-6Rのアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は可溶性IL-6Rの発現抑制効果を示した(図1)。

#### 産業上の利用可能性

本発明のヒトIL-6の発現阻害剤は、ヒトインターロイキン6の作用を抑制するため医薬として有望である。

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：90

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：

配列

CTGTCCGCCT CTGCGGGACC ATGGAGTGGT AGCCGAGGAG GAAGC ATG CTG  
Met Leu  
1

GCC GTC GGC TGC GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCC GCG  
Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala  
5 10 15

配列番号：2

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：合成DNA

配列

GCCGACGGCC AGCAT 15

配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列の種類：

配列

CATGCTTCCT CCTCGGCTAC 20

配列番号 : 4

配列の長さ : 15

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

CATGCTTCCT CCTCG 15

配列番号 : 5

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 :

配列

GGCCAGCATG CTCCTCCTC 20

配列番号 : 6

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

配列の種類 : 合成DNA

配列

GCGCAGCCGA CGGCCAGCAT 20

## 請 求 の 範 囲

1. ヒトインターロイキン-6レセプター(ヒトIL-6R)をコードするmRNAの翻訳開始コドンを含む少なくとも9個の連続する塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を有効成分とするヒトIL-6Rの発現阻害剤。

2. 配列番号: 1における翻訳開始コドンとその下流の塩基配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る請求項1に記載の発現阻害剤。

3. 塩基配列がGCCGACGGCCAGCAT(配列番号: 2)であるアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る請求項2に記載の発現阻害剤。

4. 配列番号: 1における翻訳開始コドンとその上流の塩基配列とに対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る請求項1に記載の発現阻害剤。

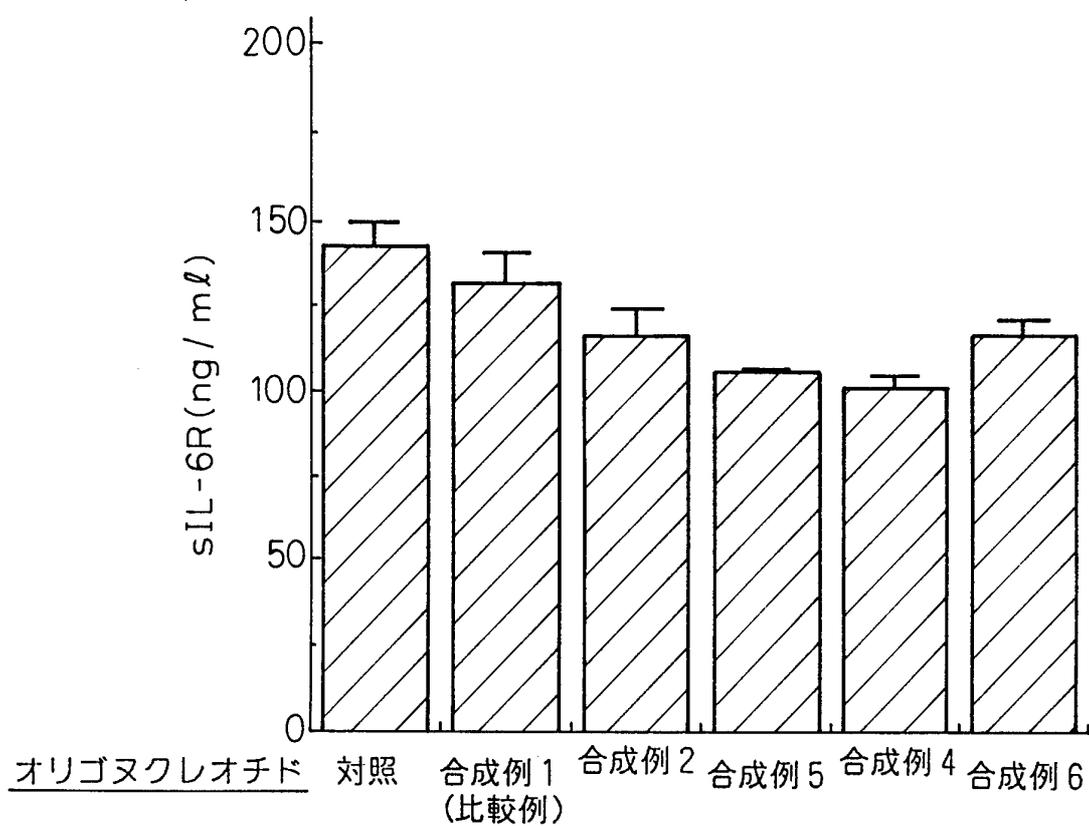
5. 塩基配列がCATGCTTCCTCCTCGGCTAC(配列番号: 3)である請求項4に記載の発現阻害剤。

6. 塩基配列がCATGCTTCCTCCTCG(配列番号: 4)である請求項4に記載の発現阻害剤。

7. 配列番号: 1における翻訳開始コドン並びにその上流及び下流の配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体を含んで成る、請求項1に記載の発現阻害剤。

8. 塩基配列がGGCCAGCATGCTTCCTCCTC(配列番号: 5)である請求項7に記載の発現阻害剤。

Fig.1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/01736

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
Int. Cl <sup>5</sup> A61K31/70, A61K48/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl <sup>5</sup> A61K31/70, A61K48/00, C07H21/00, C12N15/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Genetyx, Biosis		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Genomics, vol. 10 (No. 3), P. 539-546 (1991), J. Szpirer et. al., "The Interleukin-6-Dependent DNA-Binding Protein Gene"	1-8
A	JP, A, 2-288898 (Chuzo Kishimoto), November 28, 1990 (28. 11. 90), (Family: none)	1-8
A	Chemical; Vol. 46, No. 10, pages 681 to 684 (Kagaku Dojin (Kyoto)) October, 1989 (10. 1989), Akira Murakami "Antisense DNA method"	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
February 22, 1994 (22. 02. 94)		March 15, 1994 (15. 03. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer  Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>5</sup> A 61K 31/70, A 61K 48/00		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl <sup>5</sup> A 61K 31/70, A 61K 48/00, C 07H 21/00, C 12N 15/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
Genetyx, Biosia,		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Genomics, vol. 10 (No 3), p. 539-546 (1991), J. Szpirer et. all., "The Interleukin-6-Dependent DNA-Binding Protein Gene"	1-8
A	JP, A, 2-288898 (岸本忠三), 28. 11月. 1990 (28. 11. 90) (ファミリーなし)	1-8
A	化学; 第46巻10号, 681-684頁 (化学同人 (京都))	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日	
22. 02. 94	15. 03. 94	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 横尾俊一	4 C 7 8 2 2
電話番号 03-3581-1101 内線		3 4 5 2

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	<p>10. 1989), 村上 章, 「アンチセンス DNA 法」</p>	